

Nicole Machado Corrêa

Suplementação dietética com *Lactobacillus plantarum* e butirato de sódio no berçário do camarão-branco-do-pacífico em sistema de bioflocos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Aquicultura

Orientador: Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Corrêa, Nicole Machado

Suplementação dietética com *Lactobacillus plantarum* e butirato de sódio no berçário do camarão branco-do-pacífico em sistema de bioflocos / Nicole Machado Corrêa ; orientador, Felipe do Nascimento Vieira, 2017.

67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3. sistema BFT. 4. butirato de sódio. 5. probiótico. I. Vieira, Felipe do Nascimento . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Suplementação dietética com *Lactobacillus plantarum* e butirato de sódio no berçário do camarão-branco-do pacífico em sistema de bioflocos


Por

NICOLE MACHADO CORRÊA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

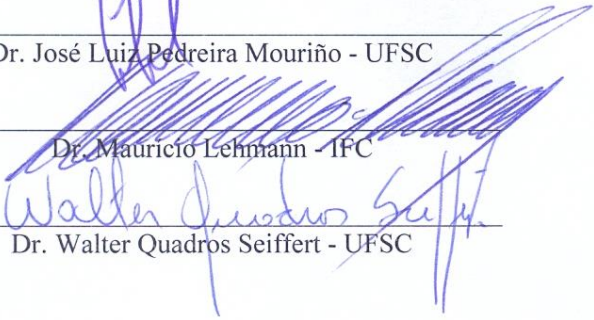
Banca Examinadora:



Dr. Felipe do Nascimento Vieira – *Orientador*

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño - UFSC

Dr. Mauricio Lehmann - IFC



Dr. Walter Quadros Seiffert - UFSC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, José Carlos e Ioni, por todo o amor e dedicação, sempre me incentivando e me encorajando a seguir meus rumos sem nunca desistir. Ao meu irmão Nikolas, por ser este irmão tão carinhoso, querido e que amo tanto, e ao Italo, por seu apoio, carinho e amor dedicados a mim.

Ao meu orientador, Felipe Vieira, por ter me dado a oportunidade de cursar este mestrado, e por seu exemplo de dedicação ao meio acadêmico e profissionalismo.

Ao professor Walter e Katt por disponibilizarem o LCM e o LAQA para a realização deste projeto.

Ao LabNutri e LAPMAR pelo auxílio para a formulação das dietas experimentais.

Ao NEPAQ por disponibilizar o espaço físico para as análises histológicas.

Ao Sr. Sérgio Pitz (Atlântico Sul Maricultura LTDA) pelo fornecimento das pós-larvas de *L. vannamei* utilizadas neste trabalho.

A Norha, por sua prestatividade e ajuda na microbiologia, sem a qual este trabalho não seria possível, e a Joselle, que com sua alegria converte o laboratório de microbiologia num ambiente amigável e de muitas risadas.

As minhas colegas de manejo Esmeralda, Jamilly e Karol, obrigada por serem tão prestativas, companheiras e dedicadas. Este trabalho também é de vocês.

A Gabi Soltes e Mari, obrigada pelo auxílio nas análises microbiológicas e por toda ajuda e amizade ao longo do mestrado.

A Tamiris Henriques, por todo seu apoio nas análises histológicas e pela sua paciência em me ensinar e ajudar.

Ao Arthur e ao Carlos Díaz, obrigada pela ajuda nas análises de qualidade de água.

Ao Ilson, Davi, Dimas e Diego, por ajudar no povoamento e por todo o suporte quando necessário, além da amizade. Ao Seu Chico e Déia, por manterem o LCM um lugar de agradável convívio.

Ao Carlos Manoel do Espírito Santo, pela sua prestatividade em tirar minhas dúvidas sobre qualidade de água.

Ao Carlos Miranda, por seu auxílio na parte hidráulica e elétrica, e por sua disponibilidade sempre.

Um agradecimento aos colegas de LCM Fernanda, Joaquim, Ariane, Priscila, Delano e Moisés, obrigada pela prestatividade e amizade ao longo do mestrado.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho fosse realizado.

“A viagem da descoberta não consiste em descobrir novas paisagens, mas em ver com novos olhos.”

Marcel Proust

"Ao mesmo tempo em que queremos aprender e explorar todas as coisas, esperamos que todas as coisas sejam misteriosas e inexploráveis, que a terra e o mar sejam infinitamente selvagens, imapeados e insondados. Nunca nos cansaremos da Natureza."

Henry David Thoreau

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito conjunto e isolado do sal orgânico butirato de sódio e do probiótico *Lactobacillus plantarum* para pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em tecnologia de bioflocos sobre os parâmetros zootécnicos, microbiológicos e histológicos, além da qualidade da água do sistema. O experimento foi conduzido em doze unidades experimentais com 0.5m³ contendo água com bioflocos. Os aditivos alimentares foram adicionados nas concentrações de 200 mL de probiótico (1x10⁷ UFC mL⁻¹) e 2% do sal orgânico (p/p) na ração, com o seguinte delineamento: 1) Probiótico; 2) Butirato; 3) Probiótico+Butirato; 4) Controle, e cada tratamento era composto por três réplicas, com duração de 35 dias de experimento. Biometrias foram realizadas uma vez por semana e, da mesma forma, foram feitas análises dos parâmetros de qualidade de água das unidades experimentais. Ao final do experimento, não foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros zootécnicos, na qualidade de água e nas contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais nos diferentes tratamentos. Contudo, os resultados mostraram diferença estatística nas contagens de bactérias ácido lácticas do trato intestinal dos camarões alimentados com as dietas contendo probiótico. Conclui-se que a adição de probiótico e o butirato de sódio não influenciou nos parâmetros produtivos dos camarões nem os parâmetros de qualidade de água, mas a inclusão do probiótico *L. plantarum* na dieta aumentou as contagens de bactérias ácido lácticas no intestino do camarão *L. vannamei*, contudo sem alterar as contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais no intestino.

Palavras-chave: Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*, sistema BFT, butirato de sódio, probiótico.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the combination and isolated effect of sodium butyrate and the probiotic *Lactobacillus plantarum* for the shrimp *Litopenaeus vannamei* post-larvae reared on biofloc technology on zootechnical, microbiological and histological parameters, as well as the water quality of the system. The experiment was carried out in twelve experimental units with 0.5m³ containing water with bioflocs. Food additives were added at the concentrations of 200 mL of probiotic (1x10⁷ UFC mL⁻¹) and 2% of the organic salt (w/w) in the diet, with the following design: 1) Probiotic; 2) Butyrate; 3) Probiotic+ Butyrate; 4) Control, and each treatment was composed of three replicates, with a duration of 35 days of experiment. Biometries were performed once a week and, similarly, analyzes of the water quality parameters of the experimental units. At the end of the experiment, no statistical differences were found in the zootechnical parameters, in the water quality and the counts of *Vibrio spp.* and total heterotrophic bacteria in the different treatments. However, the results showed a statistical difference in the counts of lactic acid bacteria from the intestinal tract of shrimp fed diets containing probiotic. In conclusion, the addition of probiotic and sodium butyrate did not influence the productive parameters of shrimp or water quality, but the inclusion of probiotic *L. plantarum* in the diet increases the counts of lactic acid bacteria in the intestine of shrimp *L. vannamei* without altering the counts of *Vibrio spp.* and total heterotrophic bacteria in the intestine.

Keywords: Aquaculture, *Litopenaeus vannamei*, BFT system, sodium butyrate, probiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama para a seleção de probióticos como agentes biocontroladores em aquicultura (Fonte: adaptado de Balcázar et al., 2006)	25
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas utilizadas para os tratamentos utilizando probiótico (<i>L. plantarum</i>) e butirato de sódio	38
Tabela 2: Parâmetros de qualidade de água dos tanques de berçário do camarão <i>L. vannamei</i> cultivado em sistema de bioflocos nos diferentes tratamentos. Média \pm desvio padrão	42
Tabela 3: Índices produtivos do camarão <i>L. vannamei</i> após 35 dias de cultivo em sistema de bioflocos. Média \pm desvio padrão	44
Tabela 4: Contagem microbiológica (valor em log) do intestino dos camarões <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes dietas após 35 dias de cultivo	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Doenças na carcinicultura.....	20
1.2	Sistema de bioflocos.....	22
1.2.1	Sistema de berçário em bioflocos.....	23
1.3	Probióticos.....	23
1.4	Ácidos orgânicos e seus sais.....	26
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	ARTIGO CIENTÍFICO.....	33
4.1	Introdução.....	34
4.2	Material e métodos.....	36
4.2.1	Origem dos camarões e manejo.....	36
4.2.2	Delineamento experimental.....	36
4.2.3	Formação e manutenção do bioflocos.....	37
4.2.4	Preparação das dietas e manejo alimentar.....	37
4.2.5	Parâmetros químicos e físicos da água.....	39
4.2.6	Desempenho Zootécnico.....	39
4.2.7	Análises Microbiológicas.....	39
4.2.8	Histologia.....	40
4.2.9	Análise estatística.....	40
4.3	Resultados.....	40
4.3.1	Parâmetros de qualidade de água.....	40
4.3.2	Parâmetros zootécnicos.....	43
4.3.3	Contagem microbiológica.....	45
4.3.4	Análise histológica.....	45
4.4	Discussão.....	45
4.5	Conclusão.....	48
4.6	Agradecimentos.....	49
4.7	Referências.....	49
5	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	57
6	ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Entre os setores de produção animal, a aquicultura é o ramo que mais rapidamente se expandiu nos últimos anos, onde peixes e produtos da pesca estão entre as mais negociadas *commodities* de alimentos em todo o mundo, representando cerca de 10% do total das exportações agrícolas. A pesca e aquicultura são importantes fontes de alimento, nutrição e meio de vida para milhões de pessoas ao redor do mundo. A oferta mundial *per capita* de pescado alcançou a marca histórica de 20 kg em 2014, graças a um intenso crescimento da aquicultura, que atualmente proporciona a metade de todo o pescado destinado ao consumo humano (FAO, 2016).

Segundo estimativas, o consumo de pescado *per capita* irá crescer em todos os continentes, com os países asiáticos sendo os principais produtores, e espera-se que até 2025 estes representem 89% da produção total. Adicionalmente, também se estima que hajam aumentos significativos da produção na América Latina, especialmente no Brasil, cuja projeção de crescimento é de aproximadamente 104% até 2025, devido a investimentos a serem realizados no setor nos próximos anos. Em especial, as previsões de aumento promissoras concentram-se em países como Brasil, Peru, Chile, China e México (FAO, 2016).

As chaves para o incremento da produção na aquicultura durante as últimas décadas têm sido através da elaboração de alimentos nutricionais para espécies alvo, o aumento nas tecnologias de produção em cultivos e o desenvolvimento de alternativas de combate a doenças na produção (NAYLOR et al., 2009; HERATH & SATOH, 2015). Como consequência desse crescimento, os sistemas de cultivo têm sido intensificados para suprir o desafio de abastecer a demanda crescente. Além disso, o pescado segue sendo um dos produtos alimentares mais consumidos no mundo, e mais da metade do valor das exportações pesqueiras procede de países em desenvolvimento (FURUYA et al., 2006; FAO, 2016).

O camarão hoje é o segundo produto da aquicultura em termos de valor econômico. São produzidos principalmente em países em desenvolvimento, e a maior parte destina-se ao comércio internacional. A espécie *Litopenaeus vannamei*, por sua vez, é considerado a mais viável para cultivos devido a sua boa adaptabilidade a variações ambientais, além do seu rápido crescimento, alta sobrevivência e tolerância a doenças em cultivos intensivos (CUZON et al., 2004; LOEBMANN et al., 2010).

Nos últimos anos, apesar da produção mundial de camarão cultivado ter crescido significativamente, os principais países produtores sofreram uma diminuição da produção em função de doenças que atingiram os cultivos. As enfermidades foram algumas das causas que afetaram drasticamente as exportações de camarão no Brasil e provocaram um declínio na atividade. Na última década, a produtividade no Nordeste brasileiro foi fortemente afetada pela Mionecrose Infecciosa (IMNV). Atualmente, a região vem enfrentando perdas na produção em função do Vírus da Mancha Branca (WSSV), cuja doença também afetou o sul do Brasil em anos recentes, inviabilizando o cultivo de camarões (PINHEIRO et al., 2007; SILVA et al., 2010). A indústria está, portanto, sob crescente busca por melhorias em suas credenciais ambientais enquanto ainda objetiva manter negócios viáveis e rentáveis (BURFORD et al., 2004).

1.1 Doenças na carcinicultura

Doenças na aquicultura são agentes limitantes de produção, e os camarões não são exceção. Com perdas substanciais devido a várias bactérias, fungos, parasitas e doenças virais, as doenças em cultivos de camarões ganharam maiores proporções depois da década de 80, quando a indústria colapsou em Taiwan (FLEGEL et al., 1996). Devido a este fato, ao longo da década de 90 tomou-se uma maior consciência da insustentabilidade socioeconômica e ambiental dos cultivos de camarões que vinham se desenvolvendo (KAUTSKY et al., 2000).

O risco de doenças na carcinicultura cresce com o aumento da área de cultivo e a alta densidade de estocagem. Altas densidades podem facilitar a proliferação de patógenos entre os cultivos, e caso haja escassez de água limpa e insuficiente remoção de matéria orgânica, o ambiente se torna sobrecarregado, conduzindo a uma degradação ambiental. Como consequência, os camarões ficam estressados pela má qualidade de água, afetando estes organismos na forma de doenças (KAUTSKY et al., 2000).

Mortalidades em massa, baixo crescimento e deformidades são alguns dos problemas que causam perdas econômicas nos cultivos de camarão (MINE & BOOPATHY, 2011). Diversos patógenos virais e bacterianos são conhecidos como agentes que causam altas mortalidades na carcinicultura. O Vírus da Mancha Branca (White Spot Syndrome Virus ou WSSV), por exemplo, é um dos maiores patógenos virais em

camarões, podendo causar mortalidades massivas nos cultivos após 7-10 dias de infecção (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2007). Outros tipos de vírus que podem ser hospedeiros em camarões, como o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), o Vírus da Cabeça Amarela (YHV), o Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) e o Vírus da Síndrome de Taura (TSV), também afetam a saúde dos camarões (FLEGEL et al., 1996). A introdução de pós-larvas e reprodutores de áreas afetadas com doenças como a Mancha Branca (WSSV) e Taura (TSV), por exemplo, foi frequentemente seguida por um rápido espalhamento destes patógenos ao longo de regiões como a Ásia e América Latina, respectivamente (LIGHTNER et al., 1999; KAUTSKY et al., 2000).

Doenças bacterianas também tem sido identificadas como uma das principais fontes de perdas de produção na indústria da carcinicultura (LIM et al., 2010). A vibriose é uma das doenças bacterianas que causa grandes perdas econômicas nos cultivos de camarões, causada pela infecção por espécies de *Vibrio* spp. (ADAMS & BOOPATHY, 2013). A espécie *Vibrio harveyi* é um destes patógenos, responsável por vasculites e lesões nos olhos em peixes, e associado à vibriose luminosa em camarões e lagostas (PRAYITNO & LATCHFORD, 1995; AUSTIN et al., 2003). Outra importante doença que atinge os cultivos é a Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS), uma enfermidade infecciosa causada por bactéria (uma linhagem de *Vibrio parahaemolyticus*), responsável por significativas perdas na produção de camarões (TRAN et al., 2013).

A ocorrência de doenças na carcinicultura tem criado barreiras para a expansão global da atividade, o que frequentemente conduz os produtores a usarem antibióticos como uma medida profilática para mitigar estes problemas (ROMANO et al., 2015). Pesquisas têm demonstrado que o uso prolongado de antibióticos pode se tornar menos efetivo devido ao aumento da resistência de cepas bacterianas em camarões, enquanto níveis excessivos dessas substâncias podem afetar negativamente o crescimento dos animais. Além disso, o uso de antibióticos pode ser um risco potencial ao meio ambiente e, ao induzir o aparecimento de resistência bacteriana, dificultar o tratamento de infecções causadas por bactérias nos cultivos (GRASLUND et al., 2003; REBOUÇAS et al., 2011).

A maior parte dos produtos profiláticos usados hoje na aquicultura são para prevenir, tratar ou mitigar doenças, cujo aparecimento pode ter sido influenciado por diversos fatores, incluindo

organismos infectados por fungos e vírus, poluentes tais como resíduos químicos e biológicos, e até mesmo escassez de alimento e nutrientes no ambiente (KAUTSKY et al., 2000; GRASLUND et al., 2003). Devido a estes problemas, existe uma constante demanda por produtos profiláticos para a aquicultura e um crescente interesse por alternativas neste setor atualmente para o tratamento e mitigação de doenças.

1.2 Sistema de bioflocos

A aquicultura tem evoluído em termos de inovação tecnológica e adaptação às necessidades de mudança, e, neste contexto, surge como alternativa a estes sistemas de produção a chamada *Biofloc Technology System* (BFT), que, segundo Wasielesky et al. (2006), é baseada na formação de flocos microbianos que servirão, entre outras vantagens, como suplemento alimentar para os organismos cultivados. Este sistema é caracterizado pelo uso de elevadas densidades de estocagem (superiores a 300 camarões/m³) e, como consequência, a produção de altas biomassas, chegando a 10 kg/m³ (SAMOCHA et al., 2004).

Segundo Tacon et al. (2002), os flocos microbianos são constituídos principalmente de microalgas, fezes, restos de organismos mortos, alimento não consumido, bactérias, protozoários, entre outros. Estes micro-organismos colonizam os substratos e assimilam os componentes nitrogenados e, assim, formam-se os flocos microbianos. Esta biomassa microbiana serve de alimento para os camarões durante o seu cultivo, e este consumo favorece tanto a nutrição dos animais, servindo de suplemento alimentar, como também um meio de promover a ciclagem dos nutrientes (BARBIERI & OSTRENSKY, 2002; MOSS et al., 2006).

Este tipo de cultivo é realizado com trocas de água reduzidas, ou até mesmo zero, e foi desenvolvido para solucionar alguns problemas relacionados à qualidade da água, onde a retirada da amônia pelas bactérias evita que haja o acúmulo de nitrogênio tóxico no sistema, bem como evita a entrada de alguns patógenos virais no meio de cultivo (AVNIMELECH, 1999; DECAMP, 2002). Para isso, ocorre a manipulação das bactérias presentes neste sistema, através do aumento da relação Carbono:Nitrogênio (15-20:1) (AVNIMELECH, 1999), que torna mais eficiente o processo de retirada do excesso de nitrogênio.

Existem três vias básicas para a remediação do material nitrogenado no sistema de bioflocos: a assimilação fotoautotrófica pelas algas, a assimilação bacteriana quimioautotrófica e a assimilação

bacteriana heterotrófica. As bactérias quimioautotróficas são responsáveis pela nitrificação no sistema, através da oxidação da amônia em compostos menos tóxicos, como o nitrito e o nitrato. Já as bactérias heterotróficas utilizam o carbono orgânico disponível como fonte de energia e assimilam nitrogênio para formação de proteínas celulares (RAY & LOTZ, 2014).

1.2.1 Sistema de berçário em bioflocos

A fase de berçário nos sistemas de produção corresponde a etapa intermediária entre a larvicultura e a engorda, com o objetivo de se obter uma maior biossegurança e um melhor controle do manejo nesta fase inicial de cultivo (WASIELESKY et al., 2013). Porém, nos sistemas convencionais são realizadas renovações constantes para manter a qualidade de água, gerando um alto fluxo de descarte de efluentes (AVNIMELECH, 2009).

Ao aliar o sistema de bioflocos a esta fase do cultivo de camarões, bons índices de qualidade da água podem ser mantidos mesmo sem serem feitas renovações nos sistemas de criação (XU et al., 2012). Alguns estudos demonstram o importante papel do sistema de bioflocos em fases iniciais de cultivos na carcinicultura, fornecendo um ambiente mais seguro para o crescimento dos camarões. Isto resulta em juvenis com melhor potencial de crescimento e sanidade, o que reflete posteriormente no desempenho zootécnico dos animais na fase de engorda (KRUMMENAUER et al., 2010; WASIELESKY et al., 2013; LORENZO et al., 2016).

Sugere-se, portanto, que a tecnologia de bioflocos é uma estratégia sustentável para apoiar o cultivo de camarões, pois pode reduzir custos de produção, bem como causar um menor impacto sobre o ambiente. Porém, sua aplicação nos sistemas convencionais de produção aquícola ainda é recente, apesar dos ótimos resultados obtidos e publicados até agora a respeito desta técnica (FERREIRA, 2009).

1.3 Probióticos

O campo de probióticos tem recebido atenção e se mostrado atrativo, principalmente nos estágios iniciais de cultivo. Em função disso, o uso de probióticos na aquicultura está aumentando com a busca por práticas menos agressivas ao ambiente, e para reduzir riscos de perdas na produção em função de doenças, o seu uso tem sido aplicado

para suprimir ou competir com organismos patogênicos. Contudo, o sucesso de sua aplicação depende da obtenção de um melhor entendimento da ecologia microbiana das espécies utilizadas como probióticas e seus efeitos como inibidoras de patógenos (MORIARTY, 1998; KESARCODI-WATSON et al., 2008; LIU et al., 2014).

O nome probiótico veio do grego “*pro bios*” que significa “para a vida” (SOCCOL et al., 2010). Este termo foi usado pela primeira vez por Lilly & Stillwell (1965) para descrever compostos secretados por um microrganismo que estimula o crescimento de outro. Na aquicultura, Verschuere et al. (2000) definiu o conceito de probióticos como “microrganismos vivos que auxiliam benéficamente o hospedeiro pela modificação da comunidade microbiana deste, melhorando a resposta contra patógenos e aprimorando a qualidade do ambiente do hospedeiro”.

Os animais aquáticos possuem uma relação muito maior com o ambiente externo do que os animais terrestres, portanto os patógenos presentes no ambiente externo (a água de cultivo) e sua proliferação são independentes do animal hospedeiro (VERSCHUERE et al., 2000). Estes patógenos potenciais são ingeridos pelo animal constantemente através de processos osmoregulatórios e de alimentação (KESARCODI-WATSON et al., 2008).

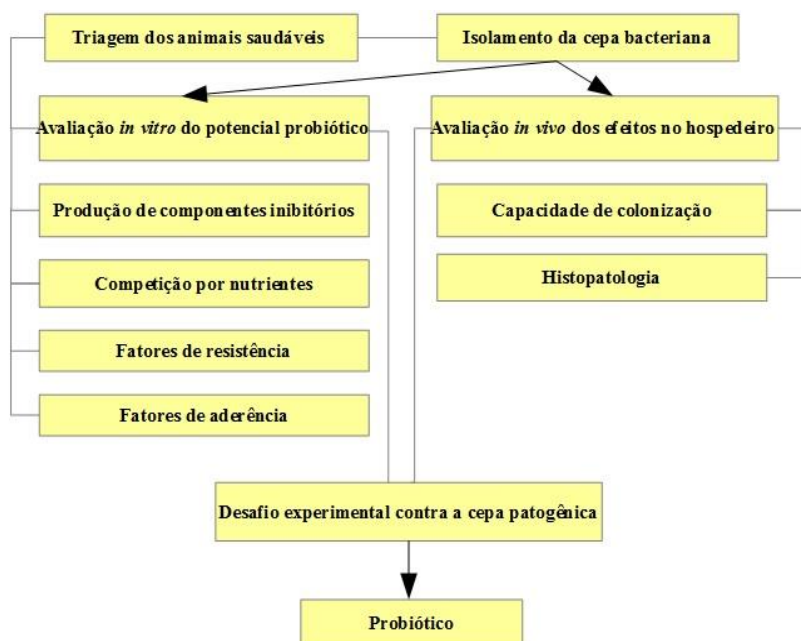
Uma opção viável para o uso de probióticos seria o isolamento, cultivo e emprego de probióticos nativos do ambiente ou do trato intestinal dos organismos que estão sendo cultivados. Verschuere et al. (2000) sugere o isolamento de microrganismos probióticos a partir do próprio hospedeiro, pois segundo este autor, um microrganismo capaz de colonizar e dominar um sítio de adesão do organismo hospedeiro seria um bom candidato para competir com microrganismos patogênicos.

Probióticos são frequentemente usados como aditivos alimentares para diversos animais, e seu uso na aquicultura é um meio de aumentar a qualidade de água pelo balanço bacteriano, substituir o uso de antibióticos, diminuir a incidência de doenças, aumentar a sobrevivência dos organismos cultivados e estimular o sistema imune (VERSCHUERE et al., 2000). Em dietas para camarões, as enzimas produzidas pelas bactérias probióticas podem auxiliar na atividade da protease, aumentando sua digestibilidade, e consequentemente facilitando a digestão dos nutrientes da dieta, por exemplo. Além disso, as enzimas fornecidas pelos probióticos toleram uma variação mais ampla de pH do que as enzimas dos camarões, o que poderia prolongar

o tempo de digestão do hospedeiro (OCHOA-SOLANO & OLMOS-SOTO, 2006).

Contudo, os resultados obtidos com probióticos podem ser afetados por diversos fatores: a espécie de bactéria probiótica, a metodologia e quantidade da administração do probiótico, as condições do hospedeiro, as condições da microbiota intestinal, o estágio de vida do animal, as tecnologias empregadas no cultivo e as condições da água (FEČKANINOVÁ et al., 2017).

Figura 1. Diagrama para a seleção de probióticos como agente biocontroladores em aquicultura (Fonte: adaptado de Balcázar et al., 2006).



A maior parte dos probióticos utilizados na aquicultura atualmente pertencem ao grupo de bactérias ácido lácticas, e seu uso mais amplo é devido ao fato de serem constituintes naturais do trato gastrointestinal de humanos e por já serem utilizadas por muito tempo na fabricação de alimentos e possuírem o status de seguras. Estas bactérias toleram a ação dos ácidos gástricos e convertem a lactose em ácido, diminuindo o pH do trato gastrointestinal e reduzindo,

consequentemente, a colonização bacteriana (TANNOCK, 1997; RINGO & GATESOUBE, 1998; RINGO et al., 2003). O gênero de bactérias ácido lácticas mais utilizado é o *Lactobacillus*, na qual a espécie *L. plantarum* é um exemplo de sucesso no emprego de bactérias lácticas como probiótico em organismos aquáticos (VINE et al., 2006). Alguns trabalhos já demonstraram a efetividade de bactérias lácticas na inibição de patógenos em camarões (CASTEX et al., 2010; VIEIRA et al., 2013), e, em particular, o uso de *L. plantarum* como promotor de resistência contra vibrioses em camarões marinhos (CHIU et al., 2007; VIEIRA et al., 2010).

1.4 Ácidos orgânicos e seus sais

A utilização extensiva de uma grande variedade de antibióticos na indústria da aquicultura, tanto como agentes terapêuticos como promotores do crescimento, aumentou os potenciais efeitos nocivos para a saúde humana e animal, bem como para o ambiente aquático (CABELLO, 2006). Com regulamentações cada vez mais rigorosas sobre o uso de antibióticos como agentes profiláticos ao redor mundo, o interesse em estudos sobre a utilização de alternativas como os ácidos orgânicos aumentou significativamente nos últimos anos. Pesquisas sobre os efeitos de suplementação de ácidos orgânicos em dietas para a aquicultura estão recebendo uma atenção global como promotores de crescimento, profiláticos contra bactérias patogênicas e também como um auxiliar na melhoria da utilização de nutrientes em animais aquáticos (ROMANO et al., 2015; SUKOR et al., 2016).

Os ácidos orgânicos são compostos ligeiramente ácidos, frequentemente associados a um grupo carboxilo, que têm a fórmula estrutural geral $R-COOH$, em que R representa o grupo funcional monovalente, e a sua acidez está associada diretamente com o grupo $-COOH$. Têm sido utilizados durante muito tempo como conservante em alimentos para animais terrestres, e podem ser encontrados naturalmente em várias fontes vegetais e animais, principalmente os ácidos graxos de cadeia curta. Estes ácidos são produzidos através da fermentação microbiana de carboidratos por diferentes espécies bacterianas, sendo um subproduto do metabolismo bacteriano no trato gastrointestinal de animais. São geralmente absorvidos pelo epitélio intestinal do hospedeiro via difusão passiva, podendo ser usados em várias vias metabólicas para geração de energia (LIM et al., 2010; LIN & CHENG, 2017; NG & KOH, 2016). Atualmente, a maior parte dos ácidos

orgânicos comercialmente utilizados na indústria alimentar são produzidos sinteticamente, geralmente na forma de sais simples ou duplos do seu ácido através da combinação com potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), etc. (NG & KOH, 2016).

A ação antimicrobiana primordial dos ácidos orgânicos no trato intestinal dos organismos é feita pela acidificação do pH no citoplasma das células bacterianas, através da capacidade destes compostos em dissociar-se e liberar íons de hidrogênio (H^+), alterando o pH citoplasmático. Uma vez que a maior parte das espécies bacterianas tem requisitos específicos de pH para um crescimento ótimo e é incapaz de crescer em condições extremas de acidez ($pH < 4,5$), as células bacterianas necessitam então de um gasto maior de ATP para estabilizar o pH ao seu ideal novamente, o que acaba consumindo uma grande quantidade de energia. Assim, as bactérias que são sensíveis para estas mudanças acabam sendo inibidas, ocorrendo então a redução das bactérias patogênicas dentro do trato intestinal do animal hospedeiro, e como benefício aumenta a resistência do organismo à doenças. Além disso, esta propriedade dos ácidos orgânicos em reduzir o pH pode conferir outras vantagens ao animal, podendo auxiliar na solubilização de minerais e fazendo estes mais disponíveis para serem absorvidos (BOOTH & STRATFORD, 2003; HOSSAIN et al., 2007; LIM et al., 2010), e em camarões, estimulando o sistema imune não-específico (WILKE & ECKEL, 2015).

O primeiro estudo em aquicultura foi feita por Ringo (2003) para avaliar os efeitos da suplementação dietética de ácidos orgânicos, utilizando lactato, acetato e propionato sobre o crescimento, a composição da digesta e a composição química do salmónídeo *Salvelinus alpinus*. Mais recentemente, várias pesquisas têm relatado o efeito do uso de ácidos orgânicos, seus sais ou a mistura destes em espécies aquáticas, especialmente em peixes, com resultados positivos sobre o crescimento, a eficiência alimentar e resistência as doenças (BARUAH et al., 2007; HOSSAIN et al., 2007; SARKER et al., 2007; NG et al., 2009; CASTILLO et al., 2014). Contudo, pesquisas utilizando sais orgânicos na carcinicultura ainda são recentes, mas já existem trabalhos relatando os benefícios destes em aumentar a sobrevivência, crescimento, digestibilidade de nutrientes e redução de patógenos em camarões (SILVA et al., 2013, 2016; KHALIL et al., 2014; CHUCHIRD et al. 2015, ROMANO et al., 2015).

A disponibilidade de informações sobre os benefícios da inclusão de ácidos orgânicos e seus sais em dietas na aquicultura ainda

são inconsistentes e parecem variar entre as espécies, tamanhos e idades do organismo aquático cultivado, além os tipos e níveis dos ácidos orgânicos e seus sais ou suas combinações (LIM et al., 2010). Dos ácidos graxos de cadeia curta, o butirato tem recebido atenção especial devido aos seus inúmeros efeitos positivos (MATIS et al., 2013).

Alguns trabalhos recentes já comprovam a efetividade do uso de butirato: mitigando inflamações intestinais e alterando a expressão gênica relacionados a mecanismos metabólicos reguladores no robalo *Dicentrarchus labrax* (RIMOLDI et al., 2016; TEROVA et al., 2016) e na morfologia intestinal e no sistema imune da carpa *Cyprinus carpio* (LIU et al., 2014), por exemplo. Especialmente para camarões, o uso de butirato beneficiou o crescimento, a atratividade do alimento e consumo de ração, o incremento na digestibilidade de nutrientes e a sobrevivência em *L. vannamei* (SILVA et al., 2013, 2016).

Sendo assim, os ácidos orgânicos tem demonstrado um bom potencial como suplemento alimentar em dietas para aumentar o crescimento, a conversão alimentar, a digestibilidade de nutrientes, alterar a microbiota intestinal e aumentar a resistencia a doenças nas espécies cultivadas. Porém, uma revisão na literatura sugere que o sucesso da aplicação dessas substâncias depende do tipo do ácido orgânico e da especie do animal aquático hospedeiro, e para isso um número maior de pesquisas devem ser desenvolvidas nesta área futuramente.

2 JUSTIFICATIVA

Hoje no setor aquícola há uma crescente demanda por métodos alternativos de inibição de patógenos dentro dos sistemas produtivos, e em função disto, cada vez mais pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de utilizar aditivos alimentares nas dietas com o intuito de melhorar a saúde dos organismos cultivados, aumentar os índices zootécnicos e melhorar a nutrição dos mesmos. Nesse sentido, a utilização de probióticos e ácidos orgânicos podem ter um bom potencial de aplicação dentro da aquicultura, uma vez que já são bem desenvolvidas suas aplicações em animais terrestres, e dentro dos sistemas aquáticos seu manejo poderia beneficiar tanto no controle da qualidade da água dos cultivos quanto no controle de enfermidades, além de promover benefícios nutricionais para os camarões.

Além disto, os problemas enfrentados pelos produtores de camarão relacionados à doenças têm estimulado a geração de novas práticas de produção, surgindo como alternativa o sistema de bioflocos. Porém, este sistema ainda possui custos elevados de implantação e manutenção, dessa forma se torna interessante aos produtores utilizar o cultivo em bioflocos na fase inicial de cultivo (como a etapa de berçário, por exemplo), quando os animais ainda estão mais suscetíveis à enfermidades bacterianas e maiores taxas de mortalidade. Assim, se torna importante o desenvolvimento de estudos com o sistema de bioflocos como um método biosseguro para a manutenção de boas condições nos sistemas produtivos visando à prevenção de bacterioses, além do aproveitamento da comunidade microbiana como fonte de alimento suplementar para os camarões e de manutenção de bons índices de qualidade de água.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar o efeito da inclusão conjunta e isolada do ácido orgânico butirato de sódio e do probiótico *L. plantarum* na dieta do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos na fase de berçário.

3.2 Objetivos Específicos

a) Determinar o desempenho zootécnico das pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas suplementadas com ácido orgânico, probiótico e sua forma combinada na fase de berçário em sistema de bioflocos;

b) Avaliar a microbiota intestinal (concentração de bactérias heterotróficas totais, *Vibrio* spp. totais e bactérias lácticas totais) das pós-larvas de *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com ácido orgânico, probiótico e sua forma combinada na fase de berçário em sistema de bioflocos;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Suplementação dietética com *Lactobacillus plantarum* e butirato de sódio no berçário do camarão-branco-do-pacífico em sistema de bioflocos

Artigo formatado segundo normas do *Boletim do Instituto de Pesca* (classificado como B1 nas áreas de Zootecnia e Recursos Pesqueiros, fator de impacto no JCR de 0,525)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito conjunto e isolado do sal orgânico butirato de sódio e do probiótico *Lactobacillus plantarum* para pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em tecnologia de bioflocos sobre os parâmetros zootécnicos, microbiológicos e histológicos, além da qualidade da água do sistema. O experimento foi conduzido em doze unidades experimentais com 0.5m³ contendo água com bioflocos. Os aditivos alimentares foram adicionados nas concentrações de 200 mL de probiótico (1x10⁷ UFC mL⁻¹) e 2% do sal orgânico (p/p) na ração, com o seguinte delineamento: 1) Probiótico; 2) Butirato; 3) Probiótico+Butirato; 4) Controle, e cada tratamento era composto por três réplicas, com duração de 35 dias de experimento. Biometrias foram realizadas uma vez por semana e, da mesma forma, foram feitas análises dos parâmetros de qualidade de água das unidades experimentais. Ao final do experimento, não foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros zootécnicos, na qualidade de água e nas contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais nos diferentes tratamentos. Contudo, os resultados evidenciaram diferença estatística nas contagens de bactérias ácido lácticas do trato intestinal dos camarões alimentados com as dietas contendo probiótico. Conclui-se que a adição de probiótico e o butirato de sódio não influenciou nos parâmetros produtivos dos camarões nem os parâmetros de qualidade de água, mas a inclusão do probiótico *L. plantarum* na dieta aumentou as contagens de bactérias ácido lácticas no intestino do camarão *L. vannamei*, contudo sem alterar as contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais no intestino.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, sistema BFT, butirato de sódio, probiótico, aquicultura.

4.1 Introdução

A pesca e a aquicultura forneceram os meios de subsistência e renda para um número estimado de 54,8 milhões de pessoas envolvidas no setor primário de produção (FAO, 2014). A carcinicultura brasileira, em especial, tem demonstrado um grande potencial ao estabelecer a atividade, demonstrando viabilidade técnica, econômica, social e ambiental, ao mesmo tempo que gera oportunidades de negócios, renda e a criação de empregos permanentes (Tahim et al., 2014).

Nos últimos anos, alguns problemas enfrentados pelos produtores de camarão, principalmente relacionados a doenças, têm estimulado a geração de novas práticas de produção, sejam estas provenientes tanto dos próprios produtores quanto de laboratórios de pesquisas. Boa parte destas práticas de cultivo têm por objetivo reduzir a quantidade de água utilizada, além de estar voltada à utilização de sistemas biosseguros de produção de organismos (Krummenauer et al., 2010). Neste contexto, surge como alternativa aos sistemas de produção a chamada *Biofloc Technology System* (BFT).

O sistema de bioflocos, segundo Wasielesky et al. (2006), é baseado na formação de flocos microbianos que servirão, entre outras vantagens, como suplemento alimentar para os organismos cultivados. Este sistema é caracterizado pelo uso de elevadas densidades de estocagem (superiores a 300 camarões/m³) e, como consequência, a produção de altas biomassas, chegando a 10 kg/m³ (Samocha et al., 2004). Neste tipo de cultivo se trabalha com trocas de água reduzidas, ou até mesmo zero, e com este procedimento é possível reduzir a descarga de efluentes ricos em nutrientes, bem como evitar a entrada de alguns patógenos virais no meio de cultivo (Decamp, 2002). Além disso, a comunidade bacteriana estabelecida no sistema com flocos microbianos pode inibir a proliferação de agentes patogênicos por exclusão competitiva por alimento e espaço (Crab et al., 2012).

No processo produtivo da carcinicultura, uma etapa importante entre a larvicultura e a engorda é a fase de berçário. Esta fase contribui de forma benéfica no rápido crescimento dos animais, permite estocar uma densidade maior de organismos, reduz os custos de produção e possibilita um maior número de ciclos de produção por ano (Emerenciano et al., 2013; Wasielesky et al., 2013). Quando aliada ao sistema de bioflocos, a fase de berçário pode resultar em juvenis com melhor potencial de crescimento e sanidade, o que reflete

posteriormente no desempenho zootécnico dos animais na fase de engorda (Krummenauer et al., 2010, Wasielesky et al., 2013).

A resposta mais comum que os organismos apresentam frente a condições de desequilíbrio ambiental é o aparecimento de doenças oportunistas provocadas por microrganismos presentes no próprio organismo ou no ambiente de cultivo (Nicolas et al., 2008). Sendo assim, com a finalidade de conciliar a intensificação dos cultivos com a biossegurança, tem se desenvolvido pesquisas relacionadas à suplementação nas dietas comerciais para promover o crescimento e saúde dos animais utilizando compostos como probióticos e ácidos orgânicos (Silva et al., 2013).

Os probióticos são suplementos microbianos vivos com efeitos benéficos para o hospedeiro, pela modificação de sua comunidade microbiana associada e para o ambiente de cultivo, assegurando melhoria no uso da alimentação e de seu valor nutricional, melhorando a resposta do hospedeiro a doenças e também a qualidade do ambiente (Verschuere et al., 2000). Entre os probióticos utilizados atualmente na aquicultura, destaca-se o grupo de bactérias lácticas, devido ao fato de serem empregadas na fabricação de alimentos e possuírem o status de seguras, além de tolerarem a ação dos ácidos gástricos e da bile e converterem a lactose em ácido láctico diminuindo, desta forma, o pH do trato gastrointestinal, reduzindo a colonização bacteriana por patógenos (Carr et al., 2002). Observando as possíveis vantagens que as bactérias ácido lácticas podem trazer, estas têm um grande potencial para serem utilizadas para estimular o sistema imune e também para uma possível melhoria da nutrição de camarões peneídeos (Silva et al., 2013).

Pesquisas sobre os efeitos de suplementação de ácidos orgânicos em dietas para a aquicultura estão recebendo uma atenção global como promotores de crescimento e profiláticos contra bactérias patogênicas, como *Vibrio* spp. (Silva et al. 2013), além de aumentar a sobrevivência de camarões (Adams & Boopathy, 2013; Su et al., 2014; Romano et al., 2015). Já o uso em conjunto de ácidos orgânicos e probióticos na aquicultura ainda é um campo de pesquisa recente e carece de estudos na área. Existem poucos trabalhos utilizando probiótico e sais orgânicos de forma conjugada, em sua maioria com animais terrestres (Wolfenden et al., 2007; Bozkurt et al., 2009).

De acordo com o exposto, é de fundamental importância que as técnicas relacionadas ao manejo e produção no sistema de bioflocos sejam aprimoradas com o intuito de se obter um aproveitamento maior

da comunidade microbiana como fonte de alimento suplementar, além do melhoramento em termos de controle de enfermidades em camarões. Além disso, a maior parte dos estudos realizados até o momento estão focados no uso de probióticos, por isso, há a necessidade em termos de pesquisa do uso de sais orgânicos isolados e/ou em conjunto com probióticos em organismos de interesse comercial como os crustáceos, em especial nas fases iniciais de cultivo, quando os organismos estão mais suscetíveis a enfermidades.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi comparar o efeito da inclusão conjunta e isolada do ácido orgânico butirato de sódio e do probiótico *L. plantarum* na dieta do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos na fase de berçário.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Origem dos camarões e manejo

Os náuplios da espécie *Litopenaeus vannamei* utilizados (linhagem SPEEDLINE HB12, de alta performance para crescimento e uniformidade de tamanhos), foram adquiridos da empresa Aquatec LTDA (Canguaretama, RN, Brasil), e transferidos para o laboratório da empresa Atlântico Sul Maricultura LTDA, onde foi realizada a larvicultura até os animais atingirem o tamanho de pós-larva quinze (PL's 15). Posteriormente, os camarões foram direcionados ao setor de larvicultura do LCM (UFSC), onde foram mantidos até atingirem o estágio de pós-larva trinta (PL's 30), atingindo o peso médio de $0,03 \pm 0,001$ g. Após este período, foi realizada a transferência para as unidades experimentais do presente estudo.

4.2.2 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em doze tanques de polietileno de 500 litros, contendo água salgada e equipados com aquecimento e aeração constante, com duração de 35 dias de cultivo. A densidade de estocagem utilizada foi de 2250 camarões m^{-3} , e o desenho experimental foi totalmente casualizado, composto por quatro tratamentos: 1) Probiótico; 2) Butirato; 3) Probiótico+Butirato e 4) Controle, onde cada tratamento contava com três réplicas.

4.2.3 Formação e Manutenção do Bioflocos

A água utilizada para a formação do inóculo de bioflocos apresentava inicialmente a concentração de 575 mg/L de sólidos suspensos totais. Desta forma, um inóculo correspondente a 35% (140L) do volume útil dos tanques (400L) do presente estudo foi transferido de um cultivo de camarão oriundo do próprio LCM para as unidades experimentais deste trabalho, e o restante do volume completado com água salgada. Assim, a concentração inicial de sólidos suspensos totais deste experimento foi de 152 mg/L. Conforme metodologia descrita por Avnimelech (1999) e Ebeling et al. (2006), quando necessário foram realizadas fertilizações orgânicas, utilizando a proporção de 20 gramas de carboidrato para a neutralização de cada grama de amônia. Como fonte de carbono foi utilizado açúcar, e a própria ração fornecida aos camarões serviu como fonte de nitrogênio para a formação dos agregados microbianos do bioflocos.

4.2.4. Preparação das dietas e manejo alimentar

Duas dietas base foram utilizadas, cujo preparo foi feito no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LabNutri-UFSC), e sua composição está descrita na Tabela 1. Na dieta contendo butirato de sódio, este foi adicionado na composição na proporção de 2% do sal orgânico (p/p) na ração, conforme metodologia descrita por Silva et al. (2013).

Depois de homogeneizadas, as amostras receberam aproximadamente 20% de água na sua composição e peletizadas, sendo posteriormente secadas em estufa a 25°C por 24 horas. Já nas dietas contendo probiótico, este era adicionado numa proporção de 200 mL de probiótico (1×10^7 UFC mL⁻¹) por quilograma de ração. A cepa bacteriana utilizada no presente estudo para a formação do probiótico (*L. plantarum*) foi obtida da própria coleção do setor de microbiologia do LCM (Vieira et al., 2008). A formulação do probiótico foi realizada em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) com adição de 3% de sal (NaCl), incubada por 24h a 35°C para o crescimento da cepa bacteriana, e posteriormente transferida para uma solução contendo soro de leite a 1×10^7 UFC mL⁻¹ para a obtenção do volume final adicionado às rações experimentais, cuja adição era feita diariamente na ração a ser consumida no dia (Anexo II).

Tabela 1. Composição das dietas utilizadas para os tratamentos utilizando probiótico (*L. plantarum*) e butirato de sódio.

Ingredientes	g.100g ⁻¹	
Farinha de resíduo de salmão ¹	48,4	48,4
Farelo de soja ²	23,7	23,7
Farinha de trigo ³	10	10
Quirera de arroz ⁴	1,8	1,8
Óleo de fígado de bacalhau ⁵	1,4	1,4
Premix vitamínico ⁶	0,4	0,4
Vitamina C ⁷	0,1	0,1
Premix macromineral ⁸	6,6	6,6
Premixmicromineral ⁹	1,6	1,6
Lecitina ¹⁰	2,0	2,0
Carboximetilcelulose ¹¹	2,0	2,0
Caulim ¹²	2,0	-
Butirato de Sódio ¹³	-	2,0

¹Tectron Nutrição animal (Paraná, Brasil). ²Nicoluzzi Rações Ltda (Santa Catarina, Brasil). ³Dona Benta (Santa Catarina, Brasil). ⁴Quirera de arroz (Rio Grande do Sul, Brasil). ⁵Hollandand & Barrett. ⁶In Vivo Nutrição e Saúde Animal, níveis de garantiapor Kg do produto: vit. A 900 mg;vit.D 25 mg; vit.E 46900 mg; vit.K 14000 mg; vit.B12 50 mg; biotina 750 mg; ácido fólico 3000 mg; niacina 70000mg; ácido pantotênico 40000 mg; vit. B6 33000; riboflavina 20000 mg; tiamina 30000 mg. ⁷Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, Brasil). ⁸In Vivo Nutrição e Saúde Animal. Níveis de garantia por Kg do produto:cobre 23330 mg;manganês 6500 mg; selênio 125 mg; zinco 100000mg, iodo 1000 mg; cobalto 50 mg, magnésio 20 mg; potássio 6,1 mg. ¹⁰Quimidrol Produtos químicos Ltda. ¹¹Diprolab Comércio de materiais para laboratório (Santa Catarina, Brasil). ¹²Mineração Riaj Ltda (São Paulo, Brasil). ¹³Laboratório Sovereign (São Paulo, Brasil).

Durante o período experimental, os camarões foram alimentados quatro vezes ao dia (08:00, 11:00 14:00 e 17:00 horas). A quantidade de ração fornecida seguiu a metodologia sugerida por Van-Wyk (1999).

4.2.5 Parâmetros Físicos e Químicos da Água

Durante o experimento, foram monitorados duas vezes ao dia (8:00 e 17:00 horas) e mantidas as concentrações de oxigênio dissolvido em $5,0 \pm 1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e temperatura da água em $28,0 \pm 1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente (oxímetro digital modelo YSI Pro20). Uma vez por semana eram realizadas coletas para a análise de pH (pHmetro digital modelo Thermo Scientific Orion Star A211), salinidade (salinômetro digital EcoSense EC300A), sólidos suspensos totais (SST), voláteis (SSV) e fixos (SSF) (APHA, 2005), nitrito (Strickland e Parsons, 1972) e nitrato (kit comercial Hach ACA01). A alcalinidade (APHA, 2005) e amônia (Strickland e Parsons, 1972) foram analisadas duas vezes por semana.

4.2.6 Desempenho Zootécnico

No decorrer do experimento foram realizadas biometrias semanais com os camarões, que eram amostrados numa proporção de 5% da densidade estocada, onde posteriormente eram pesados e estimados os pesos médios dos animais de cada unidade experimental (Anexo III). Por meio dessas biometrias, a quantidade de ração que era fornecida aos camarões foi ajustada ao longo do período experimental. Na biometria final, todos os camarões de cada repetição foram selecionados, pesados e contados.

O desempenho zootécnico dos camarões foi avaliado pela sobrevivência (%), fator de conversão alimentar (FCA), ganho de peso total (g), peso final (g), biomassa produzida (kg) e produtividade (kg m^{-3}).

4.2.7 Análises microbiológicas

Ao final do experimento, foram amostrados um total de trinta camarões de cada tanque, e em seguida retirados os tratos digestivos (Anexo I). Posteriormente, os tratos foram macerados e homogeneizados em um gral e diluídos de forma serial em solução salina (3%) e semeados em meio de cultura Agar Marinho, TCBS e Agar MRS (contagem de bactérias heterotróficas totais, *Vibrio* spp. totais e bactérias lácticas totais). Os tratos intestinais das pós-larvas que foram semeadas nas placas de Petri foram incubadas em estufa a 30°C , e após 24 horas de incubação nos meios de cultura Agar Marine e Agar

TCBS e 48 horas no meio Agar MRS foram realizadas as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.2.8 Histologia

Foram utilizados 24 animais ao final do experimento (dois camarões por tanque) para a análise histológica do trato digestivo, onde os mesmos foram fixados em solução de Davidson por 24 horas e, após este período, transferidos a uma solução de álcool a 70% para posterior procedimento padrão para a histologia (desidratação, diafanização, parafinização e inclusão em parafina). Em seguida, os blocos foram cortados com micrótomo manual (4 μm de espessura) para a formação de lâminas, e corados com eosina e hematoxilina (HE) para observação, com auxílio de microscópio de luz, do tecido digestivo dos camarões.

4.2.9 Análise estatística

Foi utilizado o método estatístico de Análise de Variância Fatorial (ANOVA), sendo primeiramente obedecidas as premissas de homocedasticidade e normalidade dos dados estatísticos através dos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Foi feita a verificação, inicialmente, de diferenças entre as réplicas; se estas não tivessem significância, os dados eram reunidos e analisados para observação e detecção de diferenças entre os tratamentos. Quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, foi utilizado o teste de Tukey de separação de médias com nível de significância de 5%.

4.3 Resultados

4.3.1 Parâmetros de qualidade de água

Os resultados encontrados para os parâmetros físico-químicos de qualidade da água neste estudo se mantiveram relativamente estáveis ao longo do experimento (Tabela 2). Os valores de salinidade ($31,80 \pm 1,45 \text{ g L}^{-1}$), pH ($8,30 \pm 0,12$) e alcalinidade ($168,69 \pm 7,25 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) não apresentaram diferenças significativas, estando todos dentro da faixa aceitável para o cultivo de camarões marinhos (Diaz & Rosenberg, 1995; Van Wyk & Scarpa, 1999).

A amônia (N-NH_3) neste experimento não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, com o valor médio encontrado de $1,00 \pm 1,31 \text{ mg L}^{-1}$. Semelhante a este parâmetro, os valores de nitrito (N-NO_2) e nitrato (N-NO_3) também se mantiveram estáveis ao longo do trabalho.

Os sólidos suspensos totais não apresentaram diferenças significativas durante o experimento, assim como os sólidos suspensos voláteis e fixos, respectivamente, e os mesmos mantiveram-se dentro dos níveis recomendados para a espécie (Ray et al., 2010).

Tabela 2. Parâmetros de qualidade de água dos tanques de berçário do camarão *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos nos diferentes tratamentos. Média \pm desvio padrão.

Tratamento	Salinidade (g.L ⁻¹)	pH	Alcalinidade (mg.CaCO ₃ .L ⁻¹)	Amônia N-NH ₃ (mg.L ⁻¹)	Nitrito N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	Nitrato N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	SST (mg.L ⁻¹)	SSV (mg.L ⁻¹)	SSF (mg.L ⁻¹)
Probiótico	31,56 \pm 1,70	8,31 \pm 0,12	175,24 \pm 4,33	0,96 \pm 1,23	0,38 \pm 0,65	13,35 \pm 2,57	356,66 \pm 17,72	169,06 \pm 26,33	187,60 \pm 16,59
Butirato	31,92 \pm 1,34	8,30 \pm 0,11	169,30 \pm 7,45	1,02 \pm 1,44	0,46 \pm 0,83	12,37 \pm 2,66	357,33 \pm 13,52	175,73 \pm 31,07	181,60 \pm 29,99
Probiótico+ Butirato	31,77 \pm 1,57	8,30 \pm 0,12	167,26 \pm 6,19	1,04 \pm 1,22	0,93 \pm 1,07	14,62 \pm 2,48	378,86 \pm 13,30	154,86 \pm 29,54	224,01 \pm 28,91
Controle	31,96 \pm 1,26	8,32 \pm 0,13	158,98 \pm 8,44	1,00 \pm 1,35	0,58 \pm 0,80	10,57 \pm 3,33	351,01 \pm 13,21	164,53 \pm 36,13	187,13 \pm 25,57

4.3.2 Parâmetros zootécnicos

O peso médio dos camarões no início do experimento foi de $0,03 \pm 0,001$ g. Ao final dos trinta e cinco dias de cultivo, os índices produtivos (\pm desvios padrão) dos camarões encontram-se na Tabela 3. Não foram encontradas diferenças significativas para os parâmetros de peso final (g), ganho em peso total (g), biomassa final (kg), produtividade final ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), fator de conversão alimentar (FCA) e sobrevivência (%).

Tabela 3. Índices produtivos do camarão *L. vannamei* após 35 dias de cultivo em sistema de bioflocos. Média \pm desvio padrão.

Tratamento	Peso Final (g)	Ganho em Peso Total (g)	Sobrevivência (%)	Biomassa Final (kg)	Produtividade Final (kg.m ⁻³)	Fator de Conversão Alimentar
Probiótico	0,90 \pm 0,01	0,83 \pm 0,06	97,15 \pm 2,57	0,75 \pm 0,06	1,95 \pm 0,07	1,22 \pm 0,05
Butirato	0,60 \pm 0,16	0,57 \pm 0,18	96,96 \pm 1,89	0,52 \pm 0,14	1,31 \pm 0,35	1,62 \pm 0,27
Probiótico+ Butirato	0,77 \pm 0,18	0,74 \pm 0,14	95,74 \pm 2,68	0,66 \pm 0,16	1,66 \pm 0,40	1,43 \pm 0,43
Controle	0,78 \pm 0,17	0,75 \pm 0,17	96,19 \pm 0,46	0,67 \pm 0,14	1,68 \pm 0,36	1,41 \pm 0,42

4.3.3 Contagem microbiológica

Após cinco semanas de cultivo, não foram encontradas diferenças significativas nas contagens de bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. (Tabela 4). Já em relação a contagem de bactérias ácido lácticas, os valores encontrados nos tratamentos Probiótico e Probiótico+Butirato foram significativamente maiores ($p>0,05$) do que nos tratamentos Controle e Butirato, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Contagem microbiológica (valor em log) do intestino dos camarões *L. vannamei* alimentados com as diferentes dietas após 35 dias de cultivo.

Tratamento	<i>Vibrio</i> spp.	Bactérias Heterotróficas Totais	Bactérias ácido-lácticas
Probiótico	3,43±3,06 ^a	7,19±0,64 ^a	5,87±0,85 ^a
Butirato	3,73±0,20 ^a	7,72±0,42 ^a	1,34±2,33 ^b
Probiótico + Butirato	2,66±2,33 ^a	8,11±1,17 ^a	4,39±0,37 ^a
Controle	4,17±0,43 ^a	7,27±0,59 ^a	2,36±2,07 ^b

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste Tukey.

4.3.4 Análise histológica

Após a histologia foi possível observar que em todas as amostras de ambos os tratamentos o intestino dos camarões estava com sua morfologia íntegra, apresentando o mesmo padrão de vilosidades e sem nenhuma danificação aparente em seus tecidos.

4.4 Discussão

Os resultados encontrados para os parâmetros físico-químicos de qualidade da água neste estudo indicam que os fatores ambientais possivelmente não influenciaram no desenvolvimento dos camarões *L. vannamei*. Quando empregado o sistema BFT, a qualidade de água pode ser mantida em boas condições, e a microbiota contida neste sistema é apta a manter a qualidade de água em cultivo de pós-larvas de *L. vannamei*, além do bioflocos servir de suplemento alimentar aos

camarões através da transformação dos compostos nitrogenados que foram produzidos pelos animais em proteína microbiana (Avnimelech et al., 1999; Emerenciano et al., 2013; Khatoon et al., 2016). Apesar dos valores dos parâmetros estarem dentro dos níveis recomendados para o cultivo do camarão-branco, os níveis de amônia neste trabalho estiveram em média em $1,0 \pm 0,03$ mg L⁻¹, provavelmente em função do alto teor proteico utilizado na alimentação das pós-larvas, que resultou num maior aporte de nitrogênio e sua acumulação no sistema. De maneira geral, os parâmetros físico-químicos da água neste experimento evidenciaram o sistema de bioflocos como uma alternativa viável para a manutenção da qualidade da água no cultivo de camarões.

Da mesma forma, neste estudo não houveram diferenças significativas entre os parâmetros zootécnicos. Como este experimento foi executado em triplicata, possivelmente a inclusão de mais unidades experimentais pudesse evidenciar as diferenças estatísticas no uso do tratamento probiótico. Ainda assim, diferentes trabalhos já demonstraram bons índices de desempenho zootécnico com uso de probiótico para *L. vannamei* quando utilizado probiótico na dieta, auxiliando no crescimento, eficiência alimentar e sobrevivência da espécie (Chiu et al., 2007; Vieira et al., 2010; Kongnumm & Hongpattarakere, 2012; Dash et al., 2014; Doan et al., 2014; Zheng et al., 2016).

Em um estudo utilizando *L. plantarum* como probiótico, Talpur et al. (2013), ao testarem três níveis de inclusão desta bactéria ácido láctica em dietas para larvas do caranguejo *Portunus pelagicus* observaram que com a adição do probiótico na concentração de 1×10^6 UFC mL⁻¹ a sobrevivência das larvas aumentou e as contagens de bactérias totais e *Vibrio* spp. mantiveram-se baixas em relação ao grupo controle, comprovando que a ação do probiótico em dietas pode ter o efeito desejado quando sua concentração encontra-se ao menos em 10^6 ou 10^7 UFC mL⁻¹ de bactérias probióticas vivas na dieta (FAO, 2016). Além disso, administrar pequenas concentrações de probióticos ou diminuir o número de dias de utilização pode causar uma baixa ou insuficiente colonização do trato intestinal (Muñoz-Atienza et al., 2013).

As contagens de bactérias heterotróficas totais e de *Vibrio* spp. no intestino dos camarões alimentados com butirato de sódio, *L. plantarum* e o grupo controle não apresentaram diferenças estatísticas. É provável que tal diferença estatística não tenha ocorrido em função do cultivo ter sido realizado em bioflocos, onde a comunidade bacteriana heterotrófica se faz presente como parte do sistema, utilizando o

carbono orgânico disponível como fonte de energia e assimilando o nitrogênio para formação de proteínas celulares. Em compensação, os camarões que receberam a dieta contendo o probiótico *L. plantarum* tiveram maiores contagens de bactérias ácido lácticas no seu conteúdo intestinal. Isto comprova a efetividade da ação da bactéria probiótica adicionada na ração em colonizar o trato intestinal dos camarões após a ingestão da dieta. Segundo Fečkaninová et al. (2016) a habilidade do microrganismo probiótico para sobreviver e multiplicar-se no hospedeiro influencia fortemente em seu efeito, e as bactérias devem ser metabolicamente estáveis e ativas na dieta ofertada e sobreviver durante a passagem através do trato intestinal em um grande número.

Alguns trabalhos demonstram os efeitos benéficos dos probióticos como imunostimulantes em camarões. Quando desafiados com diferentes espécies do gênero *Vibrio*, os probióticos estimulam a manutenção do sistema de defesa ativo, aumentando a resistência a vírus ou mantendo o controle de bactérias patogênicas (Gullian et al., 2004; Li et al., 2007; Chai et al., 2016). Embora neste trabalho não tenha sido realizado o desafio, o uso do probiótico poderia melhorar a sobrevivência dos camarões no caso de ocorrer alguma enfermidade durante o cultivo, ou até auxiliando na sanidade dos animais para um bom desempenho das fases subsequentes de produção.

No presente estudo não houveram diferenças significativas nos tratamentos utilizando o butirato de sódio. Estes resultados corroboram com os encontrados por Ramirez (2015), onde o uso de butirato de sódio utilizado na dieta de camarões *Litopenaeus vannamei* na fase de engorda em água clara não demonstrou diferenças nos parâmetros zootécnicos quando comparados aos grupos controle e probiótico analisados no estudo. Apesar destes resultados, o uso de ácidos orgânicos na carcinicultura e o conhecimento de seus efeitos como aditivo ainda é recente, mas já apresenta alguns resultados positivos em pesquisas atuais.

Em animais terrestres como porcos e frangos, por exemplo, já existem estudos comprovando que a inclusão de butirato na dieta aumentou o ganho de peso, a conversão alimentar e a microbiota intestinal destes animais (Kotunia et al., 2004; Hu & Guo, 2007), e alguns estudos de suplementação de ácidos orgânicos em dietas para peixes tem demonstrado bons resultados para o incremento no crescimento do salmão do atlântico (Baeverfjord and Kroghdahl, 1996), aumento da digestibilidade de nutrientes em tilápias (Ng et al., 2009) e na microflora intestinal de tilápia (Zhou et al., 2009), por exemplo.

Já para camarões marinhos, Silva et al. (2013) ao testarem diferentes sais orgânicos (formiato de sódio, acetato de sódio, lactato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio, fumarato de sódio, succinato de sódio ou citrato de sódio) na dieta para *L. vannamei*, observaram que houve crescimento significativamente melhor para os animais alimentados com dietas tratadas com propionato de sódio, butirato de sódio, fumarato de sódio e succinato de sódio. Da mesma forma, Romano et al. (2015) ao usarem uma combinação de quatro sais orgânicos (fórmico, láctico, málico e cítrico) na dieta para *L. vannamei* observaram que o uso destes sais aumentou significativamente a resistência dos camarões quando desafiados experimentalmente com *Vibrio harveyi*, e os melhores resultados foram observados nos camarões alimentados com as dietas cujo nível de inclusão dos sais orgânicos era de 2%/kg de ração.

Uma das hipóteses para os bons resultados com a utilização destes ácidos se refere ao efeito acidificante destes compostos, que reduzem o pH gástrico, acelerando assim a conversão do pepsinogênio em pepsina, que por sua vez melhora a absorção de aminoácidos e minerais (Baruah et al., 2007; Park et al., 2009; Romano et al., 2015, Silva et al., 2016). Amostras histológicas em experimentos utilizando butirato comprovaram que este ácido orgânico também é capaz de exercer efeitos positivos em uma gama de funções celulares relevantes para a saúde intestinal, como inibição de inflamações e carcinogêneses (Hamer, 2008), auxiliam na formação das camadas musculares do intestino de peixes (Rimoldi et al., 2016), e também podem aumentar a função absorptiva do intestino através do aprimoramento da proliferação e diferenciação de células epiteliais do intestino (Topping & Clifton, 2001; Wong et al., 2006).

4.5 Conclusão

O uso do probiótico *L. plantarum* e do butirato de sódio não alteraram o desempenho zootécnico do camarão-branco-do-pacífico no berçário utilizando o sistema de bioflocos. A adição do probiótico aumentou as contagens de bactérias ácido lácticas no intestino dos camarões, embora não tenha influenciado as contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais nos animais.

4.6 Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro correspondente ao projeto PVE/2014 e pela bolsa de mestrado concedida a Nicole Machado Corrêa. Os agradecimentos estendem-se ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade de pesquisa de Felipe Vieira (protocolo nº PQ 309868 / 2014-9), e ao Sr. Sérgio Pitz (Atlântico Sul Maricultura LTDA) pelo fornecimento das pós-larvas de *L. vannamei* utilizadas neste trabalho.

4.7 Referências

ADAMS, D.; BOOPATHY R. 2013 Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biologia*, 68: 1017–1021.

ALLAN, G. L.; MAGUIRE, G.B. 1992 Effects of stocking density in production of *Penaeus monodon* (Fabricius) in model farming ponds. *Aquaculture*, 107: 49-66.

APHA, AWWA; WEF. 1995 *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19^a ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1594p.

AVNIMELECH, Y. 1999 Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176: 227-235.

BAEVERFJORD, G.; KROGDAHL, A. 1996 Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19: 375–387.

BARUAH, K.; SAHU, N.; PAL, A.; JAIN, K.K.; DEBNATH, D.; MUKHERJEE, S. 2007 Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. *Aquaculture Research*, 38 (2): 109-120.

BOZKURT, M.; KUÇUKYILMAZ, K.; ÇATH, A.U.; ÇINAR, M. 2009 The effect of single or combined dietary supplementation of prebiotics, organic acid and probiotics on performance and slaughter characteristics of broilers. *South African Journal of Animal Science*, 39: 197-205.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. 2002 The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28 (4): 281-370.

CHAI, P.; SONG, X.; CHEN, G.; XU, H.; HUANG, J. 2016 Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 54:602-611.

CHIU, C. H.; GUU, Y.; LIU, C.; PAN, T.; CHENG, W. 2007 Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23 (2): 364-377.

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P. & VERSTRAETE, W. 2012 Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 357: 351-356.

DASH, G.; RAMAN, R.P.; PRASAD, K.P.; MAKESH, M.; PRADEEP, M.A.; SEN, S. 2014 Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as feed supplement on host associated microflora, growth, feed efficiency, carcass biochemical composition and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture*, 432: 225-236.

DECAMP, O. E. 2002 Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8: 121-137.

DIAZ, R.J.; ROSENBERG, R. 1995 Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 33: 245-303.

DOAN, H.; DOOLGINDACHBAPORN, S.; SUKSRI, A. 2014 Effects of low molecular weight agar and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immunity, and disease resistance of basa fish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880). *Fish & Shellfish Immunology*, 41: 340-345.

EBELING, J.M., TIMMONS, M.B., BISOGNI, J.J. 2006 Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257: 346-358.

EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; PAREDES, A.; GRAXIOLA, G. 2013 Evaluation of biofloc technology in pink shrimp *Farfantepenaeus duodarmus* culture: growth performance, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc. *Aquaculture International*, 21: 1381-1394.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). 2014 *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome. 223p.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). 2016 *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome. 204p.

FEČKANINOVÁ, A.; KOŠČOVÁ, J.; MUDROŇOVÁ, D.; POPELKA, P.; TOROPILOVÁ, J. 2017 The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture*, 469: 1-8.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. 2004 Selection of probiotic bacteria and study of their immunoestimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233: 1-14.

HAMER, H.M. 2008 Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27: 104-119.

HU, Z.; GUO, Y. 2007 Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *Animal Feed Science Technology*, 132: 240-249.

KHATOON, H.; BANERJEE, S.; YUAN, G.; HARIS, N.; IKHWANUDDIN, M.; AMBAK, M.; ENDUT, A. 2016 Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. *International Bioteterioration & Biodegradation*, 113: 304-309.

KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. 2012 Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 170-177.

KOTUNIA, A.; WOLINSKI, J.; LAUBITZ, D.; ZABIELSKI, R. 2004 Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets fed by artificial sow. *Journal of physiology and pharmacology*, 55: 59-68.

KRUMMENAUER, D.; CAVALLI, R.; BALLESTER, E.; WASIELESKY, W. 2010 Feasibility of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture in southern Brazil: effects of stocking density and a single or a double crop management strategy in earthen ponds. *Aquaculture Research*, 41: 240-248.

LI, K.; ZHENG, T.; TIAN, Y.; XI, F.; YUAN, J.; ZHANG, G.; HONG, H. 2007 Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnology Letters*, 29: 525-530.

MUÑOZ-ATIENZA, E.; GOMEZ-SALA, B.; ARAUJO, C.; CAMPANERO, C.; DEL CAMPO, R.; HERNANDEZ, P.E.; HERRANZ, C.; CINTAS, L.M. 2013 Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as a probiotic in aquaculture. *BMC microbiology*, 13: 1-22.

NG, W. K.; KOHL, B.C.; SUDESH, K.; ZAHRAH, A.S. 2009 Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut micro flora of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 40: 1490- 1500.

NICOLAS, P.; MONDOT, S.; ACHAZ, G.; BOUCHENOT, C.; BERNARDET, J.F.; DUCHAUD, E. 2008 Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3702–3709.

PARK, K.W.; RHEE, A.R.; UM, J.; PAIK, I. 2009 Effect of dietary available phosphorus and organic acids on the performance and egg quality of laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 18: 598-604.

RAMÍREZ, N.C.B. Avaliação do uso de sais orgânicos em conjunto com probióticos no desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Santa Catarina (Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina). Disponível em: <<http://tede.ufsc.br/teses/PAQI0441-T.pdf>> Acesso em 23 dez. 2016.

RAY, A.J.; LEWIS, B.L.; BROWDY, C.L.; LEFFER, J.W. 2010 Suspended solid removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299: 89-98.

RIMOLDI, S.; FINZI, G.; CECCOTTI, C.; GIRARDELLO, R.; GRIMALDI, A.; ASCIONE, C.; TEROVA, G. 2016 Butyrate and taurine exert a mitigating effect on the inflamed distal intestine of European sea bass fed with a high percentage of soybean meal. *Fisheries and Aquatic Sciences* 19: 1-14.

ROMANO, N.; KOH, C.B.; NG, W.K. 2015 Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 435: 228-236.

SAMOCHA, T.M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; ALI, A.M.; BURGER, J.M.; ALMEIDA, R.V.; AYUB, Z.; HARISANTO, M.; HOROWITZ, A.; BROCK, D.L. 2007 Use of molasses as carbono source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Engineering*, 36:184-191.

SILVA, B.C.; VIEIRA, F.N.; MOURIÑO, J.L.P.; FERREIRA, G.S.; SEIFFERT, W.Q. 2013 Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture*, 384: 104-110.

SILVA, B.C.; VIEIRA, F.N.; MOURIÑO, J.L.P.; RAMÍREZ, N.; SEIFFERT, W.Q. 2016 Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 47: 612-623.

STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. 1972 *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fishery Research Board Canada. 310p.

SU, X.; LI, X.; LENG, X.; TAN, C.; LIU, B.; CHAI, X.; GUO, T. 2014 The improvement of growth, digestive enzyme activity and disease resistance of white shrimp by the dietary citric acid. *Aquaculture International*, 226: 1823-1835.

TAHIM, E.F.; JUNIOR, I.F.A. A Carcinicultura do Nordeste Brasileiro e sua Inserção em Cadeias Globais de Produção: foco nos APLs do Ceará. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 52: 567-586.

TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M.; ABDULLAH, M.; BOLONG, A. 2013 Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. *Aquaculture*, 416: 173-178.

TOPPING, D.; CLIFON, P. 2001 Short chain fatty acids and human colonic function: roles of resistance starch and non-starch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81: 1031-1064.

VAN-WYK, P. 1999 Nutrition and Feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. In: (Ed.). *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida: Florida Department of Agriculture and Consumer Services. 220 p.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. 1999 Water quality requirements and management. In: VAN WYK, P.; DAVIS-HODGKINS, M., LARAMORE, R., MAIN, K.L., SCARPA, J. (Eds.). *Farming Marine*

Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, Florida. p. 128-138.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64: 655–671.

VIEIRA, F.N. BUGLIONE; C.C. MOURIÑO; J.L.P.; JATOBÁ, A.; RAMIREZ, C.; MARTINS, M.L.; BARRACCO, M.; VINATEA, L.A. 2008 Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 763-769.

VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; MOURIÑO, J.P.L.; JATOBÁ, A.; MARTINS, M.L.; SCHLEDER, D.D.; ANDREATTA, E.R.; BARRACO, M.A.; VINATEA, L.A. 2010 Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62: 631-638.

WASIELESKY, W.J; ATWOOD, H. I.; STOKES A.; BROWDY, C. L. 2006 Effect of natural production in brown water super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258: 396-403.

WOLFENDEN, A.; VICENTE, J.L.; HIGGINS, J.P.; ANDREATTI, R.L.; HIGGINS, S.E.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. 2007 Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 6: 403-405.

WONG, I.; SOUZA, R.; KENDALL, C.; EMAM, A.; JENKINS, D. 2006 Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40: 235-43.

ZHENG, Y.; YU, M.; LIU, Y.; SU, Y.; XU, T.; YU, M.; ZHANG, X. 2016 Comparison of culturable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture*, 451: 163-169.

ZHOU, Z.; LIU, Y., HE, S., SHI, P., GAO, X., YAO, B. RINGO, E. 2009 Effects of dietary potassium diformate on growth performance, feed conversion and intestinal bacterial community of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). *Aquaculture*, 291: 89-94.

5 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ADAMS, D.; BOOPATHY, R. Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. **Biologia**, v. 68, n. 6, p. 1017–1021, 2013.

AUSTIN, B.; PRIDE, A.C.; RHODIE, G.A. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. **Journal of Fish Disease**, v. 26, p. 55–58, 2003.

AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, p. 227-235, 1999.

AVNIMELECH, Y. **Biofloc Technology – A Practical Guide Book**. Baton Rouge, Louisiana: The world Aquaculture Society, 2009. 182 p.

BARBIERI, R.C.J; OSTRENSKY, N.A. **Camarões Marinhos**. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 367 p.

BARUAH, K.; et al. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 109-120, 2007.

BOOTH, I.R.; STRATFORD, M. Acidulants and low pH. In: Russel, N.J.; Gould, G.W. (Eds.), **Food Preservatives**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 25-47, 2003.

BURFORD, M.A.; et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zeroexchange system. **Aquaculture** v. 232, p. 525–537, 2004.

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137–1144, 2006.

CASTEX, M.; et al. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 622- 631, 2010.

CASTILLO, S.; et al. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, v. 433, p. 6–12, 2014.

CHIU, C. H.; et al. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 364-377, 2007.

CHUCHIRD, N.; RORKWIREE, P.; RAIKAT, T. Effect of dietary formic acid and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. **Springerplus**, v. 4, n. 1, p. 440-445, 2015.

CUZON, G.; et al. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, p. 513–551, 2004.

DECAMP, O. E. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 121-137, 2002.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). **The state of world fisheries and aquaculture**. Roma, SOFIA, 2016.

FEČKANINOVÁ, A.; et al. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. **Aquaculture**, v. 469, p. 1-8, 2017.

FERREIRA, D.A. **Produção de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* com diferentes densidades de estocagem em baixa salinidade e meio heterotrófico**. 2009. 64 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

FLEGEL, T. A turning point for sustainable aquaculture: the white spot virus crisis in Asian shrimp culture. **Aquaculture Asia**, p. 29–34, 1996.

FURUYA, W.M.; SANTOS, V.G.; SILVA, L.C.R. Exigência de lisina digestível para juvenis de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 937-942, 2006.

GRASLUND, S.; HOLMSTROM, K.; WAHLSTROM, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 81–90, 2003.

HERATH, S.S; SATOH, S. Environmental impact of phosphorus and nitrogen from aquaculture. **Feed and Feeding Practices in Aquaculture**, v. 1, p. 369-386, 2015.

HOSSAIN, M.A.; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Sciences**, v. 73, p. 1309-1317, 2007.

KAUTSKY, N.; et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145–161, 2000.

KESARCODI-WATSON, A.; et al. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, p. 1-14, 2008.

KHALIL, T.; et al. Impact of sodium lactate as a growth promoter on the hepatopancreas of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). **Egyptian Journal Aquatic Biology Fisheries**, n. 18, p. 1-11, 2014.

KRUMMENAUER, D.; et al. Feasibility of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture in southern Brazil: effects of stocking density and a single or a double crop management strategy in earthen ponds. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 240-248, 2010.

LIGHTNER, D.V. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, p. 27-52, 1999.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747–748, 1965.

LIM, C.; LÜCKSTÄDTS, C.; KLESIUS, P.H. Review: Use of Organic Acids, Salts in Fish Diets. **Global Aquaculture Advocate**, v. 5, p. 45–46, 2010.

LIN, Y.H.; CHENG, M.Y. Effects of dietary organic acid supplementation on the growth, nutrient digestibility and intestinal histology of the giant grouper *Epinephelus lanceolatus* fed a diet with soybean meal. **Aquaculture**, v. 469, p. 106-111, 2017.

LIU, H.; et al. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets. *Journal of Agriculture Food Chemical*, v. 62, p. 860-866, 2014.

LIU, W.; et al. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. **British Journal of Nutrition**, v. 112, p. 15-29, 2014.

LOEBMANN, D.; MAI, A.; LEE, J.T. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba Environmental Protection Area, Northeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 58, n.3, p. 909–923, 2010.

LORENZO, M.A.; et al. Intensive hatchery performance of Pacific white shrimp in the biofloc system under three different fertilization levels. **Aquacultural Engineering**, v. 72, p. 40-44, 2016.

MÁTIS, G.; et al. Effects of orally applied butyrate bolus on histone acetylation and cytochrome P450 enzyme activity in the liver of chicken-a randomized controlled trial. **Nutrition & Metabolism**, v. 10, p. 10-12, 2013.

MINE, S.; BOOPATHY, R. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **Current Microbiology**, v. 63, p. 1-7, 2011.

MORIARTY, D. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid Aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 164, p. 351-358, 1998.

MOSS, S.M.; FOSTER, I.P.; TACON, A.G.J. Sparing effect of pond water on vitamins in shrimp diets. **Aquaculture**, v. 258, p. 388-395, 2006.

NAYLOR R.L., et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, p.15103-15110, 2009.

NG, W.K.; et al. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut micro flora of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 1490- 150, 2009.

NG, W.K.; KOH, C.B. Application of organic acids in aquafeeds: impacts on fish growth, nutrient utilization and disease resistance. In: Luckstadt, C. (Ed.), **Standards for acidifiers, principles for the use of organic acids in animal nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, 2011. v.1, p.49-58.

OCHOA-SOLANO, J.L.; OLMOS-SOTO, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiology**, v. 23, p. 519-525, 2006.

PINHEIRO, A., et al. Epidemiological status of Taura syndrome and infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, v. 262, p. 17-22, 2007.

PRAYITNO, S.B.; LATCHFORD, J.W. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquaculture**, v. 132, p. 105-112, 1995.

RAY, A.J.; LOTZ, J.M. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. **Aquacultural Engineering**, v. 63, p. 54-61, 2014.

REBOUCAS, R. H.; et al. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environmental Resources**, v. 111, p. 21-24, 2011.

RIMOLDI, S.; et al. Butyrate and taurine exert a mitigating effect on the inflamed distal intestine of European sea bass fed with a high percentage of soybean meal. **Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, p. 1-14, 2016.

RINGØ, E.; GATESOUBE, F.J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177–203, 1998.

RINGØ E.; et al. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. **Aquaculture**, v. 227, p. 1-4, 2003.

ROMANO, N.; KOH, C.B.; NG, W.K. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 435, p. 228–236, 2015.

SAMOCHA, T.; et al. Substitution of fish meal by co extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 231, p. 197-203, 2004.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J.G.; AGUIRRE-GUZMÁN, G.; MEJÍA-RUÍZ, H. White spot syndrome virus in cultured shrimp: a review. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 1339-1354, 2007.

SARKER, M.S.A.; SATOH, S.; KIRON, V. Inclusion of citric acid and/or acid-chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 262, p. 436-443, 2007.

SILVA, V.A.; et al. A multi-season survey for infectious myonecrosis in farmed shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Pernambuco, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.104, p.161-165, 2010.

SILVA, B.C, et al. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v. 384, p. 104-110, 2013.

SILVA, B.C, et al. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 612-623, 2016.

SOCCOL, C. R.; et al. The potential of probiotics. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SUKOR, S.A.; et al. Effects of Different Dietary Organic Acids on the Survival, Growth, and Hepatopancreatic Histopathology of the Blue Swimmer Crab *Portunus pelagicus*. **Journal of Shellfish Research**, v. 35, p. 555-561, 2016.

TACON, A.G.J.; et al. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. **Aquaculture Nutrition**, v. 2, p. 121-137, 2002.

TANNOCK, G.W. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 270-274, 1997.

TEROVA, G.; et al. Effects of sodium butyrate treatment on histone modifications and the expression of genes related to epigenetic regulatory mechanisms and immune response in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed a plant-based diet. **Public Library of Science One**, v. 11, p. 1-13, 2016.

TRAN, L.; et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, p. 45-55, 2013.

VERSCHUERE, L.; et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 64, p. 655-671, 2000.

VIEIRA, F. N. et al. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 631-638, 2010.

VIEIRA, F. N. et al. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 998-1004, 2013.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review**, v. 30, p. 404-427, 2006.

WASIELESKY, W.; et al. Effect of natural production in brown water super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 258, p. 396-403, 2006.

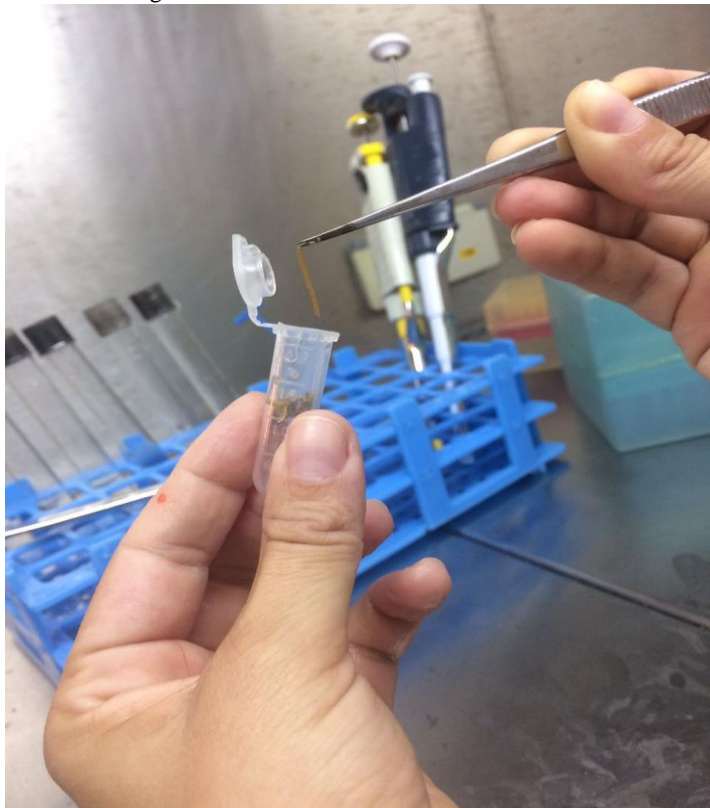
WASIELESKY, W.; et al. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: the effect of stocking densities and compensatory growth. **Journal of Shellfish Research**, v. 32, n. 2, p. 799-806, 2013.

WILKE, T.; ECKEL, G. Acidifiers concepts in aquafeed: technical and functional considerations. **Aquafeed: advances in processing & formulation**, v. 7, p. 16-19, 2015.

XU, W.J.; et al. Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. **Aquaculture**, v. 350, p. 147-153, 2012.

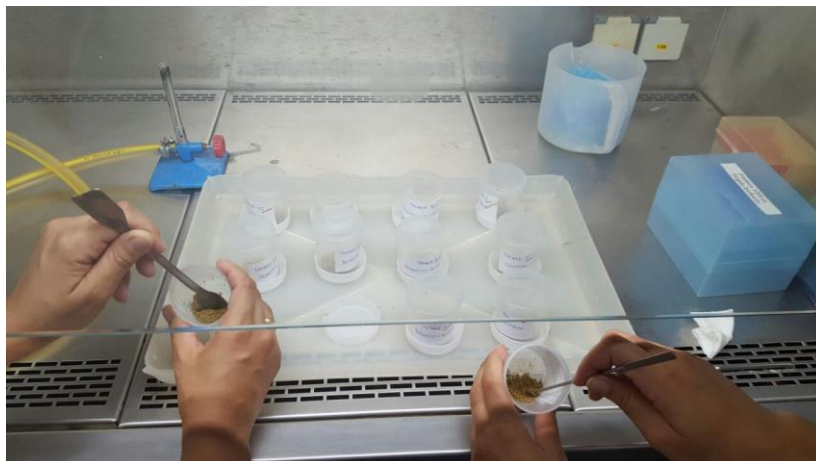
6 ANEXOS

Anexo I. Coleta do trato digestório das pós-larvas de *L. vannamei* para as análises microbiológicas.

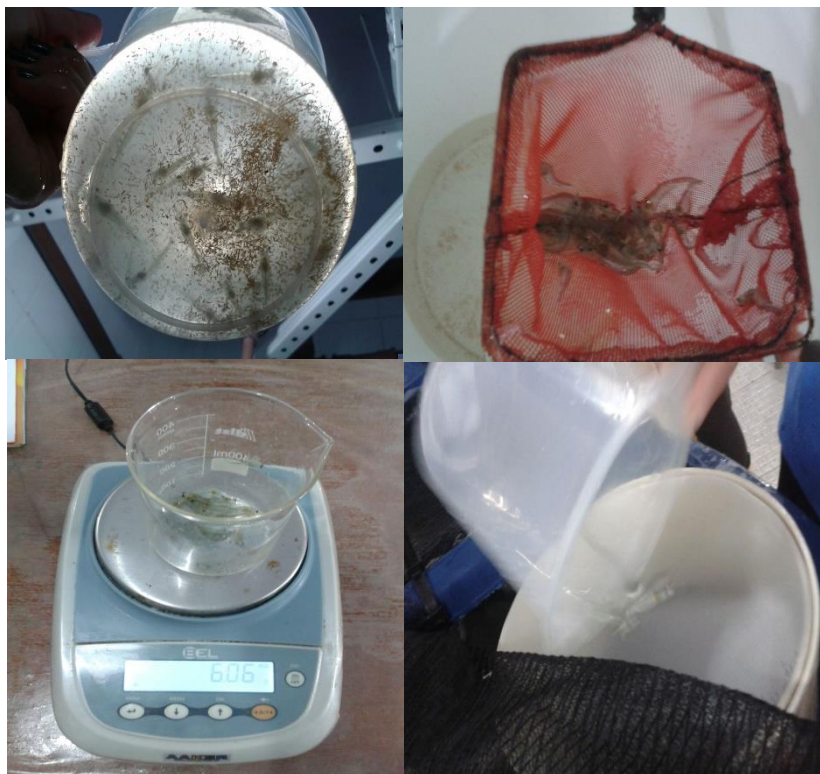


Fonte: Nicole Corrêa

Anexo II. Adição do probiótico *L. plantarum* nas dietas experimentais.



Fonte: Esmeralda Chamorro



Anexo III. Biometria semanal.

Fonte: Esmeralda Chamorro